

09/869917

01.06.00

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

JP00/3550

REC'D 27 JUL 2000

WIPO PCT

EU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年12月14日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第354862号

出 願 人

Applicant (s):

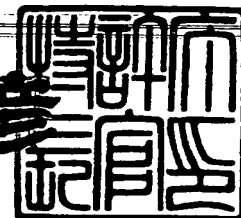
三光純薬株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 6月29日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3052097

【書類名】 特許願
【整理番号】 75728-P2
【提出日】 平成11年12月14日
【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿
【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県取手市取手 2-10-30-307

【氏名】 金島 才仁

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県牛久市南 7-31-10

【氏名】 浅井 智英

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県柏市明原 2-9-1-202

【氏名】 高橋 宏紀

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県与野市上落合 1-10-2

【氏名】 浅井 義征

【特許出願人】

【識別番号】 000175892

【住所又は居所】 東京都千代田区岩本町 1-10-6

【氏名又は名称】 三光純薬株式会社

【代表者】 渡辺 瞭

【代理人】

【識別番号】 100080230

【住所又は居所】 東京都豊島区東池袋 3丁目7番8号

若井ビル 302号

【弁理士】

【氏名又は名称】 石原 詔二

【電話番号】 03-5951-0791

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第354911号

【出願日】 平成10年12月14日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006921

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701909

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 PIVKA-IIの免疫学的測定法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体及び／又はトロンビンを試薬に添加し、血清又は血漿中のPIVKA-IIを測定する免疫学的測定法。

【請求項 2】 前記トロンビンとしてトロンビンを含む動物血清及び／又は精製トロンビンを用いる請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体として抗フィブリノーゲン及び／又は抗フィブリンを用いる請求項 1 又は 2 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体及び／又はトロンビンを試薬に加えて、血清又は血漿中のPIVKA-II (Protein Induced by Vitamin K Absence or Antagonist-II) を特異的にしかも高感度に測定する抗原抗体反応の免疫学的測定法に関する。

【0002】

【関連技術】

PIVKA-II (Protein Induced by Vitamin K Absence or Antagonist-II) は、肝細胞癌患者において特異的に上昇する、AFPと並んで肝細胞腫瘍を検出するマーカーとして広く臨床検査室で測定されている。一般的には、PIVKA-IIの特異的なモノクローナル抗体やもしくはポリクローナル抗体を吸着させた磁気ビーズやガラスビーズ、プラスチックプレート、ラテックス等に血清や血漿と第1 反応させたのち、BF洗浄を行い、酵素、蛍光物質、放射性同位元素やRu錯体等を標識した、ヒトプロトロンビンに特異的なポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を加える第2 反応をさせて、BF洗浄後、抗原抗体反応によって形成された免疫複合体に結合している酵素、蛍光物質、放射性同位元素、Ruを吸光度又は発光量を測定することによって、PIVKA-IIを測定する。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

従来は、酵素標識免疫法（EIA）でPIVKA-IIを測定してきたが、比較的小さい肝癌の例では陽性率が低く感度が不十分であったため、より高感度に測定するため、最近に至ってRu錯体を抗原又は抗体に標識する電気化学発光免疫測定法（ECLIA）が開発された。電気化学発光免疫測定法によってPIVKA-II測定の高感度化に成功した。ECLIAに限らず酵素免疫測定法、化学発光法や放射性同位元素法、ラテックス比濁法等で高感度化を実現するにあたって、検体中の非特異反応の影響を考慮しなければならない。

【0004】

PIVKA-II測定において検体中の非特異反応の影響を回避する研究を進めている過程で、高感度に試薬中にヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体及び／又はトロンビンを加えることで、さらに感度を増し、特異性が上がることを見出した。検体中の非特異反応物質として一つは検体中のフィブリン又はその関連物質を考え、もう一つに、フィブリン又はその関連物質に結合したトロンビンに着目した。特に、標識抗体又は2次抗体に用いる抗ヒトプロトロンビンとしてポリクローナル抗体を用いた場合に、これら非特異反応物質の干渉を受け、PIVKA-II測定の正誤差を招きやすい可能性になる。プロトロンビンの蛋白構造は、F₁フラグメントとF₂フラグメントにトロンビンから構成されていることが報告されている。PIVKA-II測定に用いる標識抗体には抗プロトロンビン抗体に限らず、抗F₁や抗F₂、抗（F₁+F₂）を用いることができるが、抗体の純度やトロンビンとの抗原の類似性を考えると検体中の結合型又は遊離型のトロンビンと反応してしまう可能性がある。また、PIVKA-II測定において検体中のフィブリン又はその関連物質の不溶性のものが磁気ビーズ、ガラスビーズ、ラテックス、プラスチックプレート等の担体に物理吸着を起こし、正の測定誤差を招く現象が見られた。

【0005】

フィブリン様関連物質由来の干渉とトロンビン由来の干渉を防ぐために、ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体、例えば抗フィブリノーゲンや抗フィブリン及び／又はトロンビンを試薬中に加えることで、非特異的反応を効果的に抑制し、微量のPIVKA-IIを正確に測定することに成功し、本発明を完成した。

【0006】

本発明は、ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体及び／又はトロンビンを試薬に加えて、血清又は血漿中のPIVKA-IIを特異的にしかも高感度に測定する抗原抗体反応の免疫学的測定法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために、本発明のPIVKA-IIの免疫学的測定法は、ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体及び／又はトロンビンを試薬に添加し、血清又は血漿中のPIVKA-IIを測定するものである。

【0008】

前記トロンビンとしてトロンビンを含む動物血清及び／又は精製トロンビンを用いるのが好適であり、これらは加熱しないものも加熱したものも用いることができる。

【0009】

前記ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体として抗フィブリノーゲン又は抗フィブリンを用いるのが好適である。

【0010】

本発明の用いるヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体の一例に抗フィブリノーゲンや抗フィブリンがあるが、これらはポリクローナル抗体が好ましく、フィブリノーゲンやフィブリンのみならずFDP、フィブリノペプチドA、フィブリノペプチドBなどのフィブリン様関連物質に反応性の高い抗体が望ましい。またトロンビンとしてヒト由来精製品や牛由来、豚由来、羊由来、馬由来、ウサギ由来、ニワトリ由来精製品等の動物由来精製品が用いられる。さらにまた、標識抗体用又は2次抗体の抗体を得る免疫動物とは異なる種の動物の、トロンビンを含む牛血清や羊血清、豚血清、馬血清、ニワトリ血清、ウサギ血清等の各種動物血清が用いることによって、標識抗体中に不純物として存在する抗トロンビンの反応を抑制することができる。

【0011】

本発明に用いる標識抗体又は2次抗体としては、ヒトのプロトロンビン、F₁

、 F_2 、 $F_1 + F_2$ のポリクロナール抗体を用いることができるが、ポリクロナール抗体に限らず、ヒトのプロトロンビン、 F_1 、 F_2 、 $F_1 + F_2$ のモノクロナール抗体を用いることができる。なお、 F_1 、 F_2 はプロトロンビン構成ペプチドである。また、プロトロンビンの抗原性を持つ合成ペプチドから免疫して作製したポリクロナール抗体やモノクロナール抗体をも使用可能である。

【0012】

また、本発明の実施例は電気化学発光免疫測定法の実施例で示したが、化学発光法や放射性同位元素法等の高感度化を試みる方法において有用である。本発明に用いる抗フィブリノーゲンや抗フィブリン等のフィブリノーゲン、フィブリン、FDP、フィブリノペプチドA、フィブリノペプチドB等のフィブリン様関連物質に反応する抗体は、ヒト由来フィブリン様関連物質で免疫されたものが好ましいが、ヒト由来フィブリン様関連物質と交差性のある、動物由来フィブリノーゲンやフィブリン等のフィブリン様関連物質で免疫した抗体をも用いることができる。これらの抗フィブリノーゲンや抗フィブリン等のフィブリン様関連物質に特異的な抗体は、2ステップサンドイッチ法における第1反応の反応液に加えることが好ましい。一方、トロンビンは第2反応の標識抗体液又は2次抗体液に加えることが好ましく、添加量は1～50NIH/mLが適当である。抗フィブリノーゲンや抗フィブリン等のフィブリン様関連物質特異抗体、精製トロンビン及びトロンビンを含む動物血清は必要に応じて単独もしくは併用して用いる。

【0013】

標識抗体用又は2次抗体用の抗体を得る免疫動物とは異なる種の動物のトロンビンを含む牛血清や羊血清、豚血清、馬血清、ニワトリ血清、ウサギ血清等の動物血清の添加量は1～20%が適当である。これらの異種の動物血清は、標識抗体用又は2次抗体用の抗体を免疫した動物と同種の動物血清を適宜配合できる。

【0014】

トロンビンを試薬に加える際、トロンビンの酵素活性が強いと免疫反応中に悪い影響を与えることが考えられ、標識抗体又は2次抗体を含む試薬に動物血清を添加した場合、試薬の安定性に影響を与えるから、トロンビン又は動物血清を添加する試薬にトロンビンの酵素活性を阻害するプロテアーゼ活性阻害剤を配合す

ることが好ましい。

【0015】

プロテアーゼ活性阻害剤として、臨床酵素ハンドブック（北村、馬場他編、1982年9月10日第1刷発行、講談社サイエンティフィク）のp452にあげられている阻害物質、即ち、血漿蛋白性阻害剤、ヒルジン、ベンザミジンやPMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）、NPGb等の合成阻害剤を用いることができる。しかし、これら阻害物質だけでは酵素活性を十分に阻害をかけることができないので、トロンビン精製品を熱処理、例えば、およそ40℃～65℃で加熱しても、抗原性を失わずに、酵素活性を著しく減じることを見出した。

【0016】

市販のトロンビン精製品は本来冷蔵か冷凍で保存されるべきものであり、高温にさらしてはいけないものである。本発明に用いるトロンビンの加熱温度は30℃～70℃であり、特に40℃～60℃が好ましく、15分～60分と加熱時間を短くすることができる。勿論加熱温度や加熱時間は、トロンビンの酵素活性の失活を目的とするもので、抗原性を失わずに酵素活性失活の目的を達成できれば、この限りではない。

【0017】

トロンビンとして、標識抗体の免疫動物とは異なる種の動物血清を予め加熱して用いる場合には、加熱温度が50℃～65℃、加熱時間15分～60分が適当である。この場合においてもこの限りではなく適宜、加熱時間と加熱温度は調節できることは言うまでもない。また、必要に応じて加熱せずに用いることができる。

【0018】

【実施例】

以下に本発明を実施例によって説明するが、これらの実施例は例示的にしめされるもので、限定的に解釈されるべきものではない。

【0019】

実施例 1（電気化学発光免疫測定法を用いて自動分析装置ピコルミ8220で測定した例）

反応溶液150 μ Lに検体を50 μ Lを加えたのち、抗PIVKA-IIモノクローナル抗体

を固相した磁気ビーズを25 μ Lを加える。30℃で9分間反応させたのち、ピコルミBF洗浄液(10mMトリス緩衝液)を350 μ Lを加え、磁気ビーズを磁石でトラップしながら3回洗浄する。第1反応をすませた磁気ビーズに1 μ g/mLのRu標識抗ヒトプロトロンビン抗体(ウサギ由来)を含むRu標識抗体液200 μ Lを加え、30℃で9分間反応させる。同様に磁気ビーズを磁石でトラップしながらピコルミBF洗浄液で3回洗浄する。0.1Mトリプロピルアミンを含むピコルミ発光電解液を300 μ Lを加えて、電極表面に送り、磁気ビーズに結合したRuの発光量を測定し、検体中のPIVKA-II量を求める。

【0020】

試薬組成

反応溶液: 50mMトリス緩衝液(pH7.8)、0.150M NaCl、0.01% Tween 20、

0.1 %Na₃N、5 %ウサギ血清(加熱)

Ru標識抗体液: 50mMトリス緩衝液(pH7.8)、0.150M NaCl、0.01 % Tween20、

0.1%Na₃N、1mM PMSF、1 μ g/mL Ru 標識抗ヒトプロトロンビン抗体(ウサギ由来)、5%ウサギ血清(加熱)

【0021】

(抗PIVKA-IIモノクローナル抗体固相磁気ビーズの調製)

磁気ビーズ(4.5 μ m) 30mg/mLの1 mLを試験管にとり、磁石でトラップし、上清液を捨てたあと、磁気ビーズに抗PIVKA-IIモノクローナル抗体0.5mg/mL(150mMリン酸緩衝液、pH7.8)を1 mL加え、室温で一昼夜攪拌しながら反応させる。磁気ビーズを洗浄したあと、1 %BSA・リン酸緩衝液を2mL加え、室温で1 昼夜攪拌しながらブロッキングする。使用時、1 %BSA・リン酸緩衝液で磁気ビーズ量1 mg/mLに希釈して用いる。

【0022】

(Ru標識抗ヒトプロトロンビン抗体の調製)

ウサギで免疫した抗ヒトプロトロンビン1 mg/mLに調製した1 mLに、サクシニミド基修飾ルテニウム・トリ・ジピリジルのRu錯体化合物を68 μ Lを加え、室温で30分攪拌しながら反応させたのち、2Mグリシンを50 μ L加え、反応を停止し、さらに室温で10分間攪拌しながら反応させる。最後に試料をセファデックスG-2

5 (10mMリン酸緩衝液で平衡化) に流し、Ru結合の蛋白分画を集める。このようにして得られたRu標識抗ヒトプロトロンピンは、使用時、1 $\mu\text{g/mL}$ に希釈して用いる。

【0023】

反応溶液に抗ヒトフィブリノーゲン (ウサギ由来) を180 $\mu\text{g/mL}$ を加え、抗ヒトフィブリノーゲン (ウサギ由来) 無添加の対照と8例のヒト血清を用いて特異性を比較した。各血清ともn=3で測定し、その結果を表1に示した。抗ヒトフィブリノーゲン (ウサギ由来) を添加した試薬では、測定値のバラツキが少なく、非特異反応のないことが示された。

【0024】

【表1】

mAU/mL								
	対 照			C . V .	抗フィブリンーゲン 180 μ g/mL 添加			C . V .
1	56	36	98	50.0%	26	23	24	6.3%
2	47	45	35	15.2%	27	27	28	2.1%
3	37	35	30	10.6%	26	33	29	12.0%
4	55	21	25	55.2%	20	22	19	7.5%
5	27	37	44	23.7%	15	19	15	14.1%
6	21	23	26	10.8%	19	19	20	3.0%
7	22	31	22	20.8%	21	20	18	7.8%
8	30	24	24	13.3%	24	24	24	0.0%

【0025】

実施例2

実施例1の試薬組成において反応溶液はそのまま、Ru標識抗体液に牛トロンピン精製品又はヒトトロンピン精製品を10NIH/mLを加えて、特に非特異反応の大きい検体を選んでn=10のPIVKA-IIの同時測定を行い、牛トロンピン又はヒトトロンピン無添加の対照と比較し、その結果を表2に示した。

牛トロンピン精製品又はヒトトロンピン精製品を添加した場合、対照と比較して、特異性が改善された。なお、この血清を3000rpm、10分遠心後の上清液で測定した結果、80mAU/mLであった。

【0026】

実施例 3

実施例 1 の試薬組成において反応溶液に抗ヒトフィブリノーゲン（ウサギ由来） $180\mu\text{g/mL}$ を添加し、かつRu標識抗体に牛トロンピンを 10 NIH/mL を加えて、同様に非特異反応の大きい検体について $n=10$ のPIVKA-IIの同時測定を行い、抗ヒトフィブリノーゲン（ウサギ由来）も牛トロンピンも添加していない対照と比較し、実施例 2 の結果とともに表 2 に示した。抗ヒトフィブリノーゲン（ウサギ由来）添加と牛トロンピン添加を併用した場合、牛トロンピン添加単独よりさらに特異性を増し、正確に検体中のPIVKA-IIを測定できるようになった。

【0027】

【表 2】

mAU/mL				
	対 照	ヒトロンピン 添加	牛トロンピン 添加	牛トロンピンと 抗ヒトフィブリノーゲンの 併用
1	365	121	99	97
2	219	83	145	80
3	158	83	112	79
4	209	88	107	89
5	202	95	119	72
6	150	154	104	79
7	247	84	110	80
8	133	110	103	82
9	166	121	94	85
10	245	92	103	100
平均	209.4	103.1	109.6	84.3

【0028】

実施例 4

牛トロンピン精製品 500 NIH を 1 mL の 50 mM トリス緩衝液（ 0.15 M NaCl , $\text{pH}7.8$ ）に加え、恒温水槽中にて 50°C で30分加熱した。実施例 1 の試薬組成において、反応溶液に抗ヒトフィブリノーゲン（ウサギ由来） $180\mu\text{g/mL}$ 、Ru標識抗体液にこの加熱処理した牛トロンピン精製品を 5 NIH/mL になるように加えた。非特異反応の大きい検体を用いてPIVKA-IIを測定した結果を抗ヒトフィブリノーゲン（ウサギ由来）も加熱牛トロンピンも加えない対照とともに表 3 に示した。表 3 の結果から明らかなごとく、本実施例の場合も実施例 3 の場合と同様の非特異反応を抑制

する効果を示した。なお、この加熱後のトロンビンの酵素活性を、クロモザイム TH（ベーリンガー社製）で測定すると、加熱しないときに比べて1/5に減少した。

【0029】

【表3】

	対 照	加熱牛トロンビンと 抗ヒトフィブリーノ ゲンの併用
1	133	105
2	154	87
3	152	92
4	219	132
5	150	52
6	100	87
7	137	98
8	125	90
9	162	89
10	127	86
平均	145.9	91.8

【0030】

実施例5及び6

実施例1の試薬組成において、反応溶液はそのまま、Ru標識抗体液に非加熱ウサギ血清5%（対照：最終的にウサギ血清10%）、非加熱馬血清5%（実施例5）、非加熱羊血清5%（実施例6）をそれぞれ添加して、非特異反応の大きい検体を用いて非特異反応を抑制する効果を測定し、その結果を表4に示した。

【0031】

【表 4】

mAU/mL			
	対 照	ウサギ血清 + 馬血清	ウサギ血清 + 羊血清
1	2 0 8	1 1 4	1 1 4
2	1 9 0	1 0 4	1 0 9
3	1 9 6	1 0 7	1 2 0
4	1 7 9	1 3 5	1 3 6
5	2 4 2	1 7 0	1 3 2
平均	2 0 3	1 2 6	1 2 2

【 0 0 3 2 】

対照に比べて、馬血清又は羊血清を加えたものは非特異反応が抑制された。なお、この非特異の大きい検体を3000rpm、10分遠心後に測定したら、74mAU/mLであった。

【 0 0 3 3 】

【発明の効果】

以上述べたごとく、本発明は、ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体及び／又はトロンピンを試薬に加えて、血清又は血漿中のPIVKA-IIを特異的にしかも高感度に測定することができるという効果を奏する。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体及び／又はトロンビンを含む動物血清を試薬に加えて、血清又は血漿中のPIVKA-IIを特異的にしかも高感度に測定する抗原抗体反応の免疫学的測定法を提供する。

【解決手段】

ヒトフィブリン様関連物質に反応する抗体及び／又はトロンビンを試薬に添加し、血清又は血漿中のPIVKA-IIを測定する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000175892]

1. 変更年月日	1997年 2月24日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都千代田区岩本町1-10-6
氏 名	三光純薬株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)